第 41 卷 第 4 期　　昆 虫 学 报　　Vol. 41, No. 4
1998 年 11 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Nov., 1998

滞育和非滞育棉铃虫血淋巴中蛋白质含量及图谱的比较

王方海　龚　和　钦俊德
(中国科学院动物研究所，北京　100080)

昆虫在滞育期间和非滞育期间，由于某些器官的生理功能产生差异，致使血淋巴中的化学成份发生了量或质的变化，特别是蛋白质的变化，如在滞育的马铃薯叶甲 *Leptinotarsa decemlineata*[1,2]及西南玉米杆草螟 *Diatraea grandiosella*[3,4]的血淋巴中，均发现了特殊蛋白质，即滞育蛋白。为了弄清滞育棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的血淋巴中是否也出现滞育蛋白或与滞育相关联的蛋白，及注定滞育和非滞育棉铃虫在不同发育阶段中蛋白质含量的变化和谱带特征，以进一步探索棉铃虫滞育的生理生化机制，我们通过电泳等手段对不同时期的滞育和非滞育棉铃虫的血淋巴中的蛋白质含量和图谱进行了测定和分析，结果如下：

1　材料与方法

1.1　实验昆虫

虫源由中国科学院动物研究所昆虫生态室何忠先生提供，系采自河南郑州，在 25℃、16 h 光照下用人工饲料[5]饲养繁殖。其中滞育的棉铃虫在 20℃、10 h 光照下饲养[6]，其滞育率可达 100%；非滞育的棉铃虫在 20℃、16 h 或 30℃、8 h 光照下饲养。

1.2　血淋巴样品的采集

幼虫血淋巴的收集：首先用乙醚低温麻醉法将幼虫麻醉，然后剪掉一后足，待血淋巴流出后，用定量毛细管收集，每头虫子取 15 μL 的血淋巴，每一样品组用虫 10 头（雌雄各 5 头），共取血淋巴 150 μL，加少许苯基硫脲，置于－20℃下储存备用。

蛹期血淋巴的采集：在蛹的背部，靠近头部的部位，用昆虫针刺破体壁，待血淋巴涌出后，用定量毛细管收集，每头虫子取 20 μL 的血淋巴，同样每一样品组用虫 10 头（雌雄各 5 头），共得血淋巴 200μL，加少许苯基硫脲，置于-20℃下储存备用。

1.3　Bradford 方法测定血淋巴中蛋白质含量

从 5 龄开始，分别测定饲养在滞育和非滞育条件下的处于不同发育时期的棉铃虫的血淋巴蛋白含量，具体操作如下：每一样品取 2 μL 血淋巴，加到 1mL 的考马氏亮兰试剂（将 100mg 的考马氏亮兰 G-250 溶于 50 mL 的 95%的乙醇中，再加入 85%的磷酸 100 mL，最后用水稀释至 1L）中，5min 后，于 595 nm 处测光吸收，标准曲线用牛血清白蛋白制作。

1.4　SDS-PAGE 线性梯度电泳

SDS-PAGE 线性梯度电泳的梯度范围为 5%～15%。浓缩胶由 pH6.8 的 Tris-盐酸缓冲液（100mL 溶液中含 6.06g Tris，用 1 mol/L 盐酸调 pH 至 6.8）配成浓度为 4.5%。分离胶由 pH8.8 的 Tris-盐酸缓冲液配成（100mL 溶液含 24.2 g Tris，用 1mol/L 盐酸调 pH 至 8.8）。电极上液为 pH8.3 的甘氨酸缓冲液（每升溶液含 28.8 g 的甘氨酸，6 g Tris 及 0.1%SDS）。电极下液为不含 SDS 的甘氨酸缓冲液。电泳装置为 BIO-RAD MIN-PROTEIN II，每板凝胶的体积为 70 mm×80 mm×0. 5 mm。5 mL 样品

1997-01-13 收稿，1998-01-19 收修改稿

解离液中含 5 mL 浓缩胶缓冲液，0.5 g 的 SDS 和 5μL 的β-巯基乙醇及少量溴酚兰。电泳前样品和解离液按 1∶1 混合，于 100℃下保温 5 min。电压首先调至 125V，15 min 后将电压恒定在 250 V，待电流强度不再下降，达到一个稳定值时，停止电泳。电泳在冷柜中进行，温度在 4℃左右，需 60～90 min。

电泳结束后，取出凝胶并将其置于染色液（含 0.1%的考马氏亮兰 R-250、40%甲醇、10%冰乙酸）中固定、染色 30 min，然后再置于脱色液（含 40%甲醇、10%冰乙酸）中脱色。最后用 BIO-RAD 1125B 型干胶仪制成干胶板并在 Joyce Loebl Chromoscan 3 电泳扫描仪上扫描。所用标准蛋白为肌球蛋白（200kD），β-半乳糖苷酶（116.25kD），磷酸化酶 b（92.5kD），牛血清蛋白（66.2kD），卵清蛋白（45kD）。

2 结果和分析

2.1 蛋白质含量的测定

如图 1，无论是滞育棉铃虫，还是非滞育棉铃虫，其蛋白质含量均从 5 龄开始逐渐上升，到预蛹期达到最高水平，以后又逐渐下降。但在 20℃下饲养成的滞育棉铃虫，其血淋巴中蛋白质含量在各个发育阶段均明显高于同样温度下饲养成的非滞育棉铃虫的，且在化蛹后 15 d 直至 60 d 时，蛋白质含量乃保持在一个相对稳定的水平。

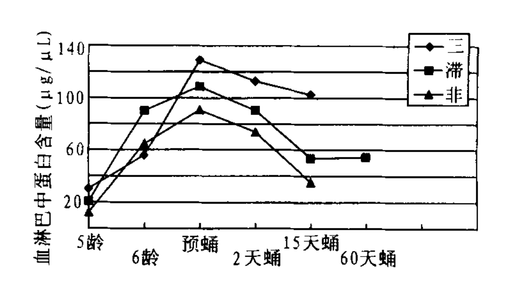


图 1　注定滞育和非滞育棉铃虫在不同发育时期血淋巴中游离蛋白质的含量

Fig. 1　The titer of hemolymph proteins from diapause-and non-diapause-destined *H. armigera* during different developmental stages

三：指饲养在 30℃，每天光照 8h 条件下的注定非滞育棉铃虫；滞：指饲养在 20℃，每天光照 10 h 条件下的注定滞育棉铃虫；非：指饲养在 20℃，每天光照 16 h 条件下的注定非滞育棉铃虫

在 30℃下饲养的非滞育棉铃虫，其蛋白质含量亦是从 5 龄开始逐渐上升，到预蛹阶段达到最高水平，然后缓慢下降，但 5、6 龄含量较低，预蛹及蛹的含量相对较高。这可能与其生活在较高温度下，某些生理状态发生了相应调节和变化有关，如产生热休克蛋白等。

为了弄清滞育蛹的血淋巴中蛋白质含量在雌雄个体中是否有区别，我们分别在化蛹后 15 d 和 60 d 后测定了雌雄滞育蛹，结果如图 2，无论在化蛹后 1 d 还是 60 d，雌雄滞育蛹的血淋巴中可溶性蛋白的含量均维持在 55 μg/μL 血淋巴左右，无明显区别。

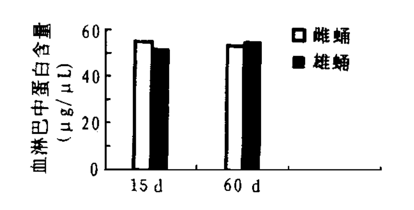


图 2　雌雄滞育蛹血淋巴中游离蛋白含量的比较

Fig. 2　Comparison of hemolymph protein levels from male and female diapause pupae

2.2 SDS 梯度电泳图谱分析

结果见表 1、图 3。各虫态的电泳结果表明，在血淋巴内可分离到 20 多条谱带，主要谱带有 12 条。

(1) 5 龄时期，在 20℃下饲养成的注定滞育和非滞育棉铃虫的谱带基本相似，但注定滞育棉铃虫的各条谱带含量均高于注定非滞育棉铃虫。在 30℃，8h 光照下饲养成的注定非滞育棉铃虫没有第 5 条谱带，且第 4 谱带的量较 20℃下饲养的注定滞育和非滞育棉铃虫要高得多。

(2) 6 龄时期，3 种条件下饲养的棉铃虫谱带极

表 1 血淋巴主要蛋白电泳谱带的比较

Table1 Comparison of the main hemolymph protein patterns

主要谱带	分子量(D)	Rf	含量(μg/μL) 5龄			6龄			预蛹		
			3非	2非	滞育	3非	2非	滞	3非	2非	滞
1	205	0.132	—	—	—	—	2.10	2.69	4.61	2.99	5.29
2	190	0.162	—	—	—	—	0.60	0.57	3.36	2.26	2.60
3	165	0.221	6.45	1.09	3.22	7.36	2.85	3.84	7.69	5.01	7.04
4	140	0.279	13.49	0.56	7.73	12.70	8.46	14.02	20.97	9.09	10.92
5	90	0.397	—	0.65	1.13	2.59	29.24	33.86	27.87	24.04	26.96
6	80	0.426	5.09	1.20	4.23	29.79	16.56	30.90	50.93	35.69	44.62
7	78	0.441	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	59	0.529	0.88	1.82	1.90	1.89	2.00	1.79	2.72	2.00	2.47
9	45	0.603	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	44	0.618	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	35	0.662	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	9	0.853	微	0.16	0.54	—	—	0.17	0.72	0.56	1.41

主要谱带	分子量(D)	Rf	含量(μg/μL) 前期蛹			中期蛹			后期蛹		
			3非	2非	滞育	3非	2非	滞♀	滞♂	滞♀	滞♂
1	205	0.132	4.57	2.26	2.69	—	—	0.91	1.31	0.82	0.84
2	190	0.162	3.38	2.49	3.00	—	—	1.43	1.05	0.50	0.64
3	165	0.221	10.85	5.73	8.42	—	—	5.29	4.89	5.99	5.58
4	140	0.279	4.31	1.00	2.84	—	—	0.81	0.63	1.21	0.93
5	90	0.397	27.57	19.89	18.43	16.81	0.71	8.66	11.76	13.54	13.79
6	80	0.426	40.60	29.92	48.82	46.71	4.34	32.56	26.10	26.59	31.35
7	78	0.441	—	—	—	—	2.72	—	—	—	—
8	59	0.529	1.19	0.87	0.98	—	—	0.86	1.42	1.06	0.38
9	45	0.603	—	—	—	11.87	10.39	—	—	—	—
10	44	0.618	—	—	—	—	9.65	—	—	—	—
11	35	0.662	—	—	—	—	7.10	—	—	—	—
12	9	0.853	3.01	2.22	1.95	—	—	1.12	1.48	1.63	1.23

注：3非＝饲养在30℃，每天光照8 h条件下的注定非滞育棉铃虫；2非＝饲养在20℃，每天光照16 h条件下的注定非滞育棉铃虫；滞＝饲养在20℃，每天光照10 h条件下的注定滞育棉铃虫

其相似，但在30℃，8 h光照下饲养的注定非滞育棉铃虫的第5条谱带的含量极其微弱，仅是20℃饲养的虫子的1/10左右。除了2，8两条谱带的含量比较接近外，注定滞育虫子的其余谱带含量均高于20℃下饲养成的注定非滞育棉铃虫的含量。

（3）预蛹时期，3种条件下饲养的谱带基本一样，但在同样的温度20℃下，注定滞育棉铃虫的各条

谱带含量均高于注定非滞育棉铃虫的。

（4）前期蛹，3 种条件下饲养的谱带基本一致，只是注定滞育棉铃虫各谱带的含量（除 5，12 基本接近外）均高于 20℃下饲养的注定非滞育棉铃虫。

（5）中期蛹，3 种条件下饲养的血淋巴图谱则完全不一样，30℃，8 h 饲养的非滞育棉铃虫只有 3 条主要谱带，5，6，9，其中 9 是特有谱带，而 20℃下饲养的非滞育棉铃虫，其谱带主要有 6 条，其中 7，10，11 是其特有谱带，而滞育棉铃虫的各条谱带基本未变，与前期蛹相比，只是各条带的含量均有所下降。同时我们发现雌雄间谱带极其一致，且含量也接近。

滞育蛹在经历了 2 个月之后，即到了后期蛹阶段，其血淋巴图谱与中期蛹相比未发生任何变化，且含量也维持在相对稳定的水平，从而说明当蛹滞育后，其内部生理代谢功能极其微弱，整个蛋白质成份及其含量基本保持不变。

从上面的结果可以看出当棉铃虫化蛹后，由于非滞育棉铃虫经过短暂的几天后继续发育，其蛋白图谱在化蛹后 15 d 左右出现明显变化，而滞育棉铃虫由于化蛹后，经过一段时间逐渐进入滞育状态，整个生理活动降到极低水平，故蛹期不同阶段的血淋巴蛋白质变化不大，显现出的图谱基本相似，量也没多大变化。

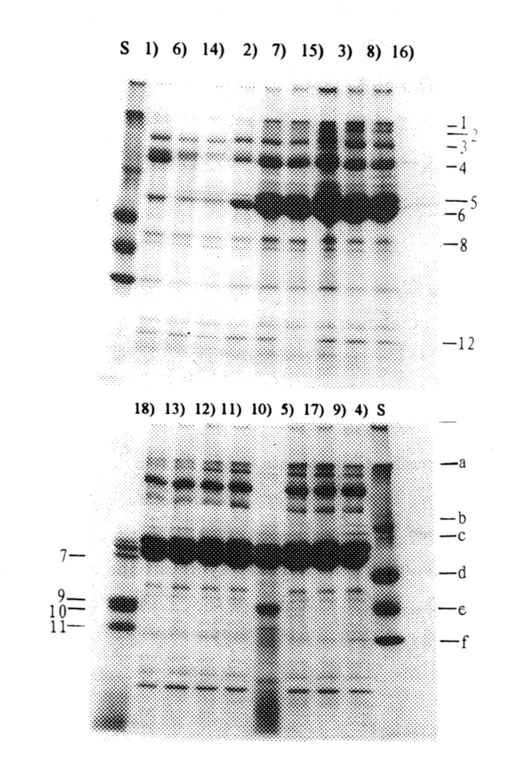


图 3　注定滞育和非滞育棉铃虫的不同发育时期的血淋巴蛋白电泳图

（5%～15%SDS 线性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳）

Fig. 3　SDS-PAGE patterns of hemolymph proteins from diapause-and non-diapause-destined *H. armigera* at different developmental stages

	5 龄	6 龄	预蛹	前期蛹	中期蛹		后期蛹	
3 非：	1）	2）	3）	4）	5）			
滞：	6）	7）	8）	9）	10）雌	11）雄	12）雌	13）雄
2 非：	14）	15）	16）	17）	18）			

S 为标准蛋白，含有以下几种蛋白：

a. 肌球蛋白 myosin 205kD；b. β-半乳糖苷酶 β－glactosidase 116kD；c. 磷酸化酶 b phophorylase b 97.4kD；d. 牛血清清蛋白 bovine serum albumin 66kD；e. 卵清蛋白 oval albumin 45kD；f. 碳酸酐酶 carbonic anhydrase 29kD

3　讨论

以上研究结果看到，从 5 龄至蛹的各个发育阶段中，在 20℃下饲养成的滞育棉铃虫血淋巴中可溶性蛋白含量比在同样温度下饲养成的非滞育棉铃虫中的明显偏高，但电泳图谱无明显差异（中期蛹的差别主要是由于：在 20℃下，非滞育蛹经 15d 的发育，已进入成虫形成阶段，整个发育代谢生理已完全区别于滞育蛹的缘故），它表明温度和光照等生态因子诱导的滞育效应可引起棉铃虫血淋巴中可溶性蛋白质量的变化（增多），但不能引起质的变化（未出现特异蛋白，即滞育蛋白）。其血淋巴蛋白质含量增多可能与储存蛋白及载体蛋白等含量的增多有关，而这些蛋白的增多将利于棉铃虫度过漫长的滞育期。

昆虫血淋巴中含有大量可溶性蛋白，应用电泳方法对血淋巴中蛋白分析和鉴定是最为简便快捷的一种途径。在 *Phormia rufa* 和 *P. polyctena* 幼虫中，分辨出 14 条蛋白质带，在 *P. pratensis* 中有 17 条带，而在 *Antheraea domestious* 中发现有 22 条带。大量研究表明，昆虫血淋巴中含有的可溶性蛋白主要

包括载体蛋白（如保幼激素结合蛋白，脂-结合蛋白等），储存蛋白和一些酶类（如海藻糖酶，保幼激素酯酶，原酚氧化酶和酚氧化酶等）[7]。在棉铃虫的血淋巴蛋白图谱分析过程中，我们可分辨出20多条谱带，其中许多蛋白谱带随着发育阶段的不同，其含量往往发生明显的变化，且有些蛋白谱带只在特定的发育阶段中出现。由于我们目前还无法了解所有这些蛋白谱带具体代表那一种性质的蛋白，及其具有什么样的生理功能，故我们还不能把所观察到的现象与滞育和非滞育棉铃虫的生理功能有机地联系在一起，来进一步阐述棉铃虫的滞育机理，这些还有待于今后的努力。

参 考 文 献

1 Briers T, de Loof D. Moulting hormone activity in the adult Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say. in relation to reproduction and diapause. Int. J. Invert. Reprod., 1981, 3: 145～155

2 De Kort C A D, Koopmanschap A B. Nucleotide and deduced amino acid sequence of a cDNA clone encoding diapause protein 1, an aryl-phorin-type storage hexamer of the Colorado potato beetle. J. Insect Physiol., 1994, 40 (6): 527～535

3 Turunen S, Chippendale G M. Proteins of the fat body of non-diapausing and diapausing larvae of the south-western corn borer, *Diatraea grandiosella*: effect of juvenile hormone. J. Insect Physiol., 1980, 26: 163～169

4 Turunen S, Chippendale G M. Fat body protein associated with the larval diapause of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*: synthesis and characteristics. Comp. Biochem. Physiol., 1980, 65B: 595～603

5 吴坤君. 棉铃虫的紫云英-麦胚人工饲料. 昆虫学报，1985，28：22～29

6 李 超，谢宝瑜. 光周期和温度的联合作用对棉铃虫种群滞育的影响. 昆虫知识，1981，18：58～61

7 ［美］M. 罗克斯坦编. 昆虫生物化学. 北京：科学出版社，1988. 77～84

MEASUREMENT AND ELECTROPHORESIS PATTERNS OF HEMOLYMPH PROTEIN FROM DIAPAUSE- AND NON-DIAPAUSE-DESTINED *HELICOVERPA ARMIGERA*

Wang Fanghai Gong He Qin Junde

(Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080)